

DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-43-47

Опыт использования иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови для диагностики наследственных тромбоцитопатий

Е.В. Юшкова¹, Н.А. Подоплелова^{1,2}, Д.В. Федорова¹, А.Л. Хорева¹, А.Ю. Щербина¹, П.А. Жарков¹, М.А. Пантелеев^{1,2}

¹ФГБУ «Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России, Москва

²ФГБУН «Центр теоретических проблем физико-химической фармакологии» РАН, Москва

Метод иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови является недавно разработанным подходом к дистанционной диагностике различных патологий тромбоцитов, включая *MYH9*-ассоциированную макротромбоцитопению, синдром Бернара–Сулье, тромбастению Гланцмана, синдром серых тромбоцитов, синдром Вискотта–Олдрича и т. д. В данной статье приведен опыт использования иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови для диагностики наследственных нарушений тромбоцитов в НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Целью исследования было перенести эту относительно трудоемкую методику и внедрить ее в рутинную лабораторную практику. Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Ключевые слова: тромбоцитопения, тромбоциты, нарушения тромбоцитов, иммунофлуоресценция

Юшкова Е.В. и соавт. Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии. 2023; 22 (3): 43–7.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-43-47

A single-center experience of using immunofluorescence staining of blood smears for the diagnosis of hereditary thrombocytopathies

E.V. Yushkova¹, N.A. Podoplelova^{1,2}, D.V. Fedorova¹, A.L. Khoreva¹, A.Yu. Shcherbina¹, P.A. Zharkov¹, M.A. Panteleev^{1,2}

¹Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation, Moscow

²Center for Theoretical Problems of Physicochemical Pharmacology, Moscow

The method of immunofluorescence staining of blood smears is a recently developed approach to the remote diagnosis of various platelet pathologies including *MYH9* disorders/*MYH9*-related disease, biallelic Bernard–Soulier syndrome, Glanzmann thrombasthenia, gray platelet syndrome, and others. We report here the experience of introducing this method at the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology (Moscow, Russia), which is the main national pediatric hematology hospital that provides diagnosis and therapy to children with blood disorders throughout the country. Our study aimed to transfer this relatively labor-intensive and skill-sensitive method and introduce it into routine laboratory practice, and to perform its validation. The study was approved by the Independent Ethics Committee and the Scientific Council of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology.

Key words: thrombocytopenia, platelets, platelet disorders, immunofluorescence

Yushkova E.V., et al. Pediatric Hematology/Oncology and Immunopathology. 2023; 22 (3): 43–7.
DOI: 10.24287/1726-1708-2023-22-3-43-47

Наследственные нарушения тромбоцитов представляют собой гетерогенную и трудную для диагностики группу заболеваний [1–3]. В большинстве случаев кровотечения у пациентов с наследственными нарушениями тромбоцитов не являются жизнеугрожающими. Тем не менее постановка точного диагноза имеет большое значение в связи с пожизненным риском развития тяжелых кровотечений при оперативных вмешательствах, а также актуальностью вопроса о назначении антиагрегантов пожилым пациентам [4, 5]. В случае наследственной тромбоцитопении точная диагностика обычно избавляет пациента от диагноза иммунной тромбоцитопении и неоправданного применения иммунодепрессантов и спленэктомии.

К нарушениям функции тромбоцитов могут приводить различные дефекты, включая изменения экспрессии поверхностных рецепторов, нарушения внутриклеточных сигнальных путей тромбоцитов, дефицит α - и/или плотных гранул и нарушения их секреции. Для большинства заболеваний из группы тромбоцитопатий постановка диагноза – сложный процесс, требующий большого количества лабораторных тестов с последующей комплексной оценкой их результатов [6]. При этом соответствующие диагностические тесты могут быть выполнены только в некоторых специализированных центрах. Также стоит отметить, что для большинства тестов необходима только свежая кровь. Все это приводит к необ-

© 2023 ФГБУ «НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Поступила 27.12.2022
Принята к печати 28.04.2023

Контактная информация:

Подоплелова Надежда Александровна, ведущий научный сотрудник лаборатории клеточного гемостаза и тромбоза ФГБУ «НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева» Минздрава России
Адрес: 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1
E-mail: podoplelovan@yandex.ru

© 2023 by «D. Rogachev NMRCPHO»

Received 27.12.2022

Accepted 28.04.2023

Correspondence:

Nadezhda A. Podoplelova, PhD, a leading researcher at the Laboratory of Cell Hemostasis and Thrombosis of the Dmitry Rogachev National Medical Research Center of Pediatric Hematology, Oncology and Immunology of Ministry of Healthcare of the Russian Federation
Address: 1 Samory Mashela St., Moscow 117997, Russia
E-mail: podoplelovan@yandex.ru

ходимости пациентов совершать дальние поездки для проведения соответствующих обследований и постановки точного диагноза. Кроме того, для большинства тестов требуется значительный объем крови, недопустимый для педиатрических пациентов. При этом большое число нарушений, связанных с дефектами компонентов тромбоцитов (такими как адгезивные рецепторы и цитоскелетные белки) могут быть обнаружены при помощи иммунофлуоресцентного анализа мазка крови [7]. Для этой методики требуется минимальное количество крови, что позволяет применять ее у маленьких детей. А подготовленные и высушенные образцы могут храниться и пересылаться на значительные расстояния, что позволяет использовать данный метод для подтверждения диагнозов пациентов из труднодоступных регионов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Настоящее исследование одобрено независимым этическим комитетом и утверждено решением ученого совета НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева.

Пациенты

В работу включены деперсонифицированные результаты лабораторных исследований, выполненных у пациентов в возрасте от 9 до 40 лет, получавших стационарную или амбулаторную помощь в условиях НМИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева. Исследование носило ретроспективный характер. Всего включены 13 пациентов с установленным диагнозом наследственной тромбоцитопении или тромбоцитопатии.

Диагноз считался подтвержденным, если: а) была идентифицирована генетическая мутация либо б) лабораторный тест, например проточная цитометрия, подтверждал диагноз, т. е. выраженное снижение или отсутствие комплексов гликопротеина (GP) I_bX или GP IIb/IIIa (IIb β 3) при синдроме Бернара–Сулье и тромбоцитопении Гланцмана соответственно, и в) симптомы, наблюдаемые у пациентов, соответствовали клинической картине заболевания, описанной в литературе.

Приготовление мазков крови

Первый этап подготовки образцов заключался в приготовлении стандартных высушенных на воздухе мазков крови (10–20 мазков для каждого пациента). Для приготовления использовали свежую венозную кровь, взятую в вакуумные пробирки с цитратом натрия 3,2% или 3,8%. Перед фиксацией образцы хранили только при комнатной температуре в сухом месте не менее суток и не более 2 нед. Важно отметить, что ни в коем случае нельзя помещать образцы крови или мазки в холодильник, так как это приводит к деполимеризации периферического кольца из тубулиновых микротрубочек [8].

Фиксация и хранение образцов

Высушенные мазки крови фиксировали холодным ацетоном в течение 2 мин. Затем образцы высушивали на воздухе до полного испарения ацетона. Зафиксированные и высушенные образцы можно использовать для иммунофлуоресцентной окраски сразу либо хранить длительное время (несколько недель) при –20°C.

Иммунофлуоресцентное окрашивание мазков крови

На образцах гидрофобным карандашом обводили регион интереса (диаметр около 1 см). Затем зафиксированные образцы инкубировали с 10% козьей сывороткой в течение 30 мин при комнатной температуре во влажной камере, удаляли со стекол излишки жидкости и инкубировали образцы с первичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре во влажной камере. Для каждого антитела подбирали оптимальное разведение (таблица 1). После инкубации с первичными антителами образцы промывали 3 раза по 5 мин фосфатно-солевым буфером Дульбекко (pH = 7,2), удаляли со стекол излишки жидкости и инкубировали образцы со вторичными антителами в течение 1 ч при комнатной температуре во влажной камере в темноте. Для вторичных антител использовали разведение 1:400. После инкубации со вторичными антителами образцы промывали 3 раза по 5 мин фосфатно-солевым буфером Дульбекко (pH = 7,2), удаляли со стекол излишки жидкости, наносили флуоресцентную среду для заключения, закрывали покровным стеклом. Готовые образцы анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа, экспрессию интересующего белка оценивали по сравнению с нормальным контролем, окрашенным параллельно.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На основании опубликованных в литературе данных [7] была подобрана панель антител для диагностики наиболее распространенных наследственных нарушений тромбоцитов. Для выбранных антител были подобраны концентрации, позволяющие визуализировать различные структуры тромбоцитов (плазматическая мембрана, плотные гранулы, лизосомы, α -гранулы, цитоскелет). Используемые в панели маркеры приведены в таблице 1.

Полученная в результате панель антител была протестирована на образцах здоровых добровольцев и пациентов с известными диагнозами, установленными по клинической картине и генетическому анализу. Список патологий с указанием числа пациентов и обнаруженными характерными морфологическими особенностями клеток в мазке крови приведен в таблице 2. Выявленные в результате анализа

Таблица 1

Антитела, применяемые для иммунофлуоресцентной окраски мазков крови больных с подозрением на наследственную тромбоцитопению

Table 1

Antibodies used for immunofluorescence staining of blood smears from patients with suspected inherited thrombocytopenia

Параметр Parameter	Антиген Antigen	Клон антител Antibody clone	Производитель Manufacturer	Используемое разведение антител Antibody dilution
Мембранные белки Membrane proteins	GP1bIX	FMC-25	Bio-Rad	1:500
	GP1IbIIIa	P2	Becton Coulter	1:2000
	CD34 ^a	4H11	eBioscience	1:100
Маркеры α-гранул α-granule markers	Фактор фон Виллебранда Von Willebrand factor	Поликлональные антитела Polyclonal antibodies	Dako	1:2000
	P-селектин (CD62p) P-selectin (CD62p)	AK-4	BD Bioscience	1:800
Маркеры плотных гранул Dense granule markers	LAMP2	H4B4	Santa Cruz	1:20
	CD 63	H5C6	BD Bioscience	1:2500
Маркеры лизосом Lysosome markers	LAMP1	H5G11	Santa Cruz	1:20
Цитоскелетные белки Cytoskeletal proteins	Тяжелая цепь немышечного миозина (NMMIIa) Non-muscle myosin heavy chain (NMMIIa)	Поликлональные антитела Polyclonal antibodies	Sigma Aldrich	1:10 000
	β ₁ -тубулин β ₁ -tubulin	TUB 2.1	Sigma Aldrich	1:100
	Филамин ^b Filamin ^b	PM6/317	Santa Cruz	1:4000
	α-актинин ^b α-actinin ^b	H-2	Santa Cruz	1:100

Примечание. ^a – не входит в основную панель, используется у пациентов с подозрением на дефицит α-гранул для дифференциации синдрома серых тромбоцитов и *GF11B*-мутации; ^b – не входит в основную панель, используется у пациентов с подозрением на нарушения цитоскелета, в частности филамин А-ассоциированную тромбоцитопению.

Note. ^a – not included in the main panel, used in patients with suspected α-granule deficiency to differentiate gray platelet syndrome and *GF11B* mutation; ^b – not included in the main panel, used in patients with suspected cytoskeletal disorders, in particular filamin-A related thrombocytopenia.

Таблица 2

Характерные морфологические особенности тромбоцитов пациентов

Table 2

Typical morphological features of the patients' platelets

Патология Disorder	Число проанализированных пациентов The number of patients analyzed	Характерные морфологические особенности Typical morphological features
Нарушения мембранных GP Platelet membrane glycoprotein abnormalities		
Синдром Бернара–Сюлье Bernard–Soulier syndrome	2	Увеличенные в размерах тромбоциты со сниженным или полностью отсутствующим сигналом по GP1bIX Enlarged platelets with reduced or absent GP1bIX signaling
Тромбастения Гланцмана Glanzmann thrombasthenia	2	Тромбоциты имеют нормальные размеры и уменьшенный или полностью отсутствующий сигнал по GP1IbIIIa Normal-sized platelets with reduced or absent GP1IbIIIa signaling
Нарушения цитоскелета Diseases of the cytoskeleton		
Синдром Вискотта–Олдрича Wiskott–Aldrich syndrome	2	Уменьшенные в размерах тромбоциты. Периферическое тубулиновое кольцо деформировано и перекручено в форме восьмерки Decreased platelet size. The peripheral tubulin ring is deformed and twisted into a figure of eight
<i>MYH9</i> -макротромбоцитопения <i>MYH9</i> -macrothrombocytopenia	2	Увеличенные в размерах тромбоциты, в гранулоцитах при окрашивании тяжелой цепи немышечного миозина наблюдаются тельца включения The platelets are enlarged. Non-muscle myosin heavy chain staining shows inclusion bodies
Дефициты α-гранул α-granule deficiencies		
Синдром серых тромбоцитов (мутация в <i>NBEAL2</i>) Gray platelet syndrome (mutation in the <i>NBEAL2</i> gene)	2	Тромбоциты нормального размера. Снижен или полностью отсутствует сигнал от α-гранулярных белков (фактор фон Виллебранда, P-селектин). Отсутствует окрашивание по CD34 Normal-sized platelets. The signal from α-granular proteins (von Willebrand factor, P-selectin) is reduced or absent. No CD34 staining
<i>GF11b</i>	2	Тромбоциты нормального размера. Снижен или полностью отсутствует сигнал от α-гранулярных белков (фактор фон Виллебранда, P-селектин). Есть окрашивание по CD34 The platelets are of normal size. The signal from α-granular proteins (von Willebrand factor, P-selectin) is reduced or absent. CD34 staining is seen
Синдром Якобсена Jacobsen syndrome	1	Тромбоциты нормального размера. Снижен или полностью отсутствует сигнал от α-гранулярных белков (фактор фон Виллебранда, P-селектин). Отсутствует сигнал от маркеров плотных гранул (LAMP2, CD63) The platelets are of normal size. The signal from α-granular proteins (von Willebrand factor, P-selectin) is reduced or absent. No signal from dense granule markers (LAMP2, CD63)

морфологические особенности тромбоцитов приведены на *рисунке*.

Выявленные в результате анализа образцов пациентов и здоровых добровольцев морфологические особенности тромбоцитов полностью согласуются с описанными в литературе, в том числе в работах профессора Грайнахера [7]. А именно: пациенты с синдромом Бернара–Сулье имеют увеличенные в размерах тромбоциты со сниженным или полностью отсутствующим сигналом по GPIbIX [9]. Тромбоциты пациентов с тромбастенией Гланцмана имеют нормальные размеры и уменьшенный или полностью отсутствующий сигнал по GPIIb/IIIa [10, 11]. Для *MUN9*-ассоциированной макротромбоцитопении характерны увеличенные в размерах тромбоциты, в гранулоцитах при окрашивании тяжелой цепи мышечного

миозина наблюдаются тельца включения [12, 13]. Тромбоциты пациентов с синдромом Вискотта–Олдрича, напротив, уменьшены в размерах, наблюдаются деформированные кольца β_1 -тубулина (периферическое кольцо изогнуто в форме восьмерки) [14]. Перечисленные морфологические особенности тромбоцитов приведены на *рисунке*.

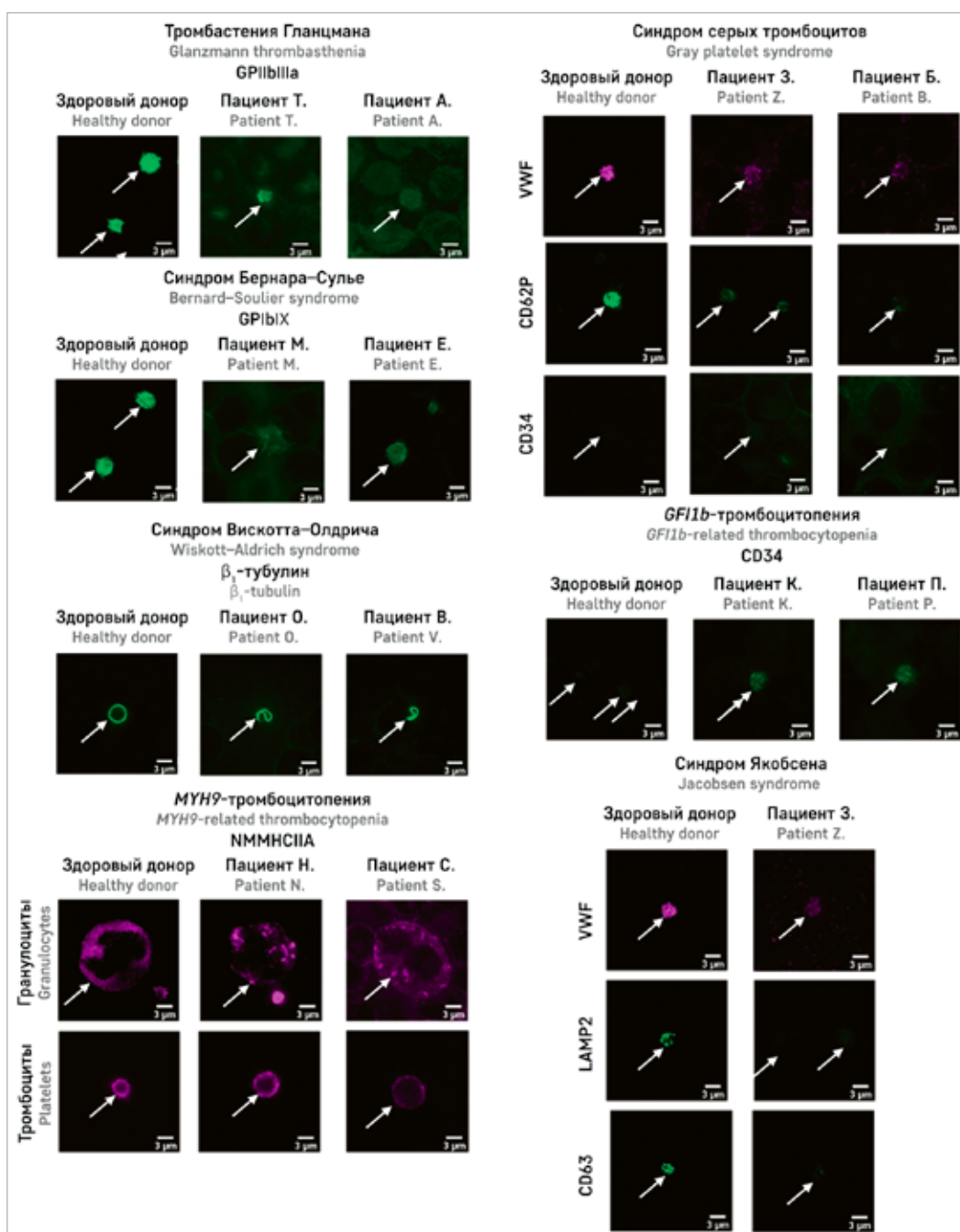
Таким образом, оптимизированный метод иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови позволяет идентифицировать наиболее распространенные наследственные патологии тромбоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

Имунофлуоресцентный анализ мазков крови позволяет охарактеризовать морфологические

Рисунок
Морфологические особенности тромбоцитов у пациентов с наследственными нарушениями тромбоцитов. Типичные микрофотографии для здоровых добровольцев и пациентов. Зеленым и пурпурным цветом показана флуоресценция соответствующих антител. Стрелками выделены тромбоциты. Масштаб горизонтальных отрезков, нанесенных на микрофотографии, соответствует 3 мкм

Figure
The morphological features of platelets in patients with inherited platelet disorders. Typical photomicrographs of healthy volunteers and patients. Green and magenta colors show the fluorescence of the corresponding antibodies. The arrows indicate platelets. Horizontal scale bars: 3 μ m



особенности тромбоцитов, что, в свою очередь, позволяет использовать его для диагностики наследственных нарушений тромбоцитов. Данный метод требует минимального количества крови (не более 100 мкл), поэтому его можно применять у пациентов детского возраста. Даже при тяжелой тромбоцитопении в мазке крови присутствует необходимое количество тромбоцитов, позволяющее провести анализ. Необходимо отметить, что, несмотря на простоту преаналитических этапов, для непосредственного окрашивания и анализа образцов требуются значительный опыт и специализированное оборудование, из-за чего аналитические этапы целесообразнее делать в крупных медицинских центрах. Однако, благодаря простоте транспортировки образцов, это не вызовет существенных сложностей.

Стоит учитывать, что в настоящее время метод иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови имеет ряд ограничений. В частности, пока он не подходит для диагностики ряда наследственных нарушений тромбоцитов, например макротромбоцитопении *ACTN1*, *ANKRD26*-связанной и *ETV6*-связанной тромбоцитопений. Кроме того, пока не выявлены достоверные маркеры, позволяющие определить приобретенные нарушения тромбоцитов, например иммунную тромбоцитопению. Однако эта область быстро развивается и идентифицируются новые диагностические маркеры. В литературе встречаются данные об экспрессии тяжелой цепи немышечного миозина IIB в тромбоцитах при наличии мутации *RUNX1* или *FLI1* [15]. Таким образом,

стоит ожидать, что в ближайшее время увеличится количество тромбоцитарных нарушений, диагностируемых с использованием иммунофлуоресцентного анализа мазков крови.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данной работы был оптимизирован и апробирован метод иммунофлуоресцентного окрашивания мазков крови, позволяющий диагностировать наиболее распространенные наследственные нарушения тромбоцитов независимо от возраста пациента и его удаленности от крупных медицинских центров. Метод был апробирован на образцах крови пациентов с известными диагнозами. Выявленные особенности тромбоцитов совпадали с описанными в литературе.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Исследование выполнено при поддержке гранта Президента Российской Федерации МК-6271.2021.1.4 и гранта Российского научного фонда 23-45-10039.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы статьи подтвердили отсутствие конфликта интересов, о котором необходимо сообщить.

ORCID

Podoplelova N.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-8013-1112>

Fedorova D.V. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4567-1871>

Khoreva A.L. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8697-4206>

Shcherbina A.Yu. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3113-4939>

Zharkov P.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-4384-6754>

Panteleev M.A. ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-8128-7757>

Литература

- Gresele P.; Subcommittee on Platelet Physiology of the International Society on Thrombosis and Hemostasis. Diagnosis of Inherited Platelet Function Disorders: Guidance from the SSC of the ISTH. *J Thromb Haemost* 2015; 13 (2): 314–22. DOI: 10.1111/jth.12792
- Watson S.P., Lowe G.C., Lordkipanidzé M., Morgan N.V.; GAPP consortium. Genotyping and phenotyping of platelet function disorders. *J Thromb Haemost* 2013; 11 Suppl 1: 351–63. DOI: 10.1111/jth.12199
- Федорова Д.В., Жарков П.А., Плясунова С.А., Серёгина Е.А., Игнатова А.А. Диагностика врожденных нарушений функций тромбоцитов: современное состояние вопроса. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2017; 16 (1): 83–95. DOI: 10.24287/1726-1708-2017-16-1-83-95
- Boender J., Kruij M.J.H.A., Leebeek F.W.G. A diagnostic approach to mild bleeding disorders. *J Thromb Haemost* 2016; 14 (8): 1507–16. DOI: 10.1111/jth.13368
- Bolton-Maggs P.H.B., Chalmers E.A., Collins P.W., Harrison P., Kitchen S., Liesner R.J., et al. A review of inherited platelet disorders with guidelines for their management on behalf of the UKHCDO. *Br J Haematol* 2006; 135 (5): 603–33. DOI: 10.1111/j.1365-2141.2006.06343.x
- Пономаренко Е.А., Игнатова А.А., Федорова Д.В., Жарков П.А., Пантелеев М.А. Функциональная активность тромбоцитов: физиология и методы лабораторной диагностики. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2019; 18 (3): 112–9. DOI: 10.24287/1726-1708-2019-18-3-112-119
- Greinacher A., Pecci A., Kunishima S., Althaus K., Nurden P., Balduini C.L., et al. Diagnosis of inherited platelet disorders on a blood smear: a tool to facilitate worldwide diagnosis of platelet disorders. *J Thromb Haemost* 2017; 15 (7): 1511–21. DOI: 10.1111/jth.13729
- Bender M., Stritt S., Nurden P., Van Eeuwijk J.M.M., Zieger B., Kentouche K., et al. Megakaryocyte-specific Profilin1-deficiency alters microtubule stability and causes a Wiskott–Aldrich syndrome-like platelet defect. *Nat Commun* 2014; 5: 4746. DOI: 10.1038/ncomms5746
- López J.A., Andrews R.K., Afshar-Kharghan V., Berndt M.C. Bernard-Soulier Syndrome. *Blood* 1998; 91: 4397–418.
- Кумскова М.А., Дёмина И.А., Подоплелова Н.А., Баландина А.Н., Серёгина Е.А., Бондар Е.В. и др. Диагностика тромбастении Гланцмана с помощью исследования показателей плазменного и тромбоцитарного звеньев гемостаза. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2015; 14: 17–24.
- George J., Caen J., Nurden A. Glanzmann's Thrombasthenia: The Spectrum of Clinical Disease. *Blood* 1990; 75: 1383–95.
- Savoia A., De Rocco D., Panza E., Bozzi V., Scandellari R., Loffredo G., et al. Heavy chain myosin 9-related disease (MYH9-RD): Neutrophil inclusions of myosin-9 as a pathognomonic sign of the disorder. *Thromb Haemost* 2010; 103 (4): 826–32. DOI: 10.1160/TH09-08-0593
- Kunishima S., Matsushita T., Kojima T., Sako M., Kimura F., Jo E.K., et al. Immunofluorescence Analysis of Neutrophil Nonmuscle Myosin Heavy Chain-A in MYH9 Disorders: Association of Subcellular Localization with MYH9 Mutations. *Lab Invest* 2003; 83 (1): 115–22. DOI: 10.1097/01.lab.0000050960.48774.17
- Мартынов А.А., Морозова Д.С., Хорева А.Л., Пантелеев М.А., Щербина А.Ю., Свешникова А.Н. Особенности внутриклеточной кальциевой сигнализации тромбоцитов при синдроме Вискотта–Олдрича. *Вопросы гематологии/онкологии и иммунопатологии в педиатрии* 2020; 19 (1): 100–7. DOI: 10.24287/1726-1708-2020-19-1-100-107
- Antony-Debré I., Bluteau D., Itzykson R., Baccini V., Renneville A., Boehlen F., et al. MYH10 protein expression in platelets as a biomarker of RUNX1 and FLI1 alterations. *Blood* 2012; 120: 2719–22.